



AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO DO FLAVONOIDE NARINGINA EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO (MCF-7)

Matheus Gimenez Buzo (PIBIC/CNPq-FA-UEM), Liliane Menezes Fernandes, Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: arbvepv@wnet.com.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/ Maringá, PR.

Genética/Mutagênese.

Palavras-chave: Biocomposto; Cultura de Células; Ensaio do Cometa.

Resumo: Os flavonoides são compostos de origem vegetal, utilizados na indústria como corantes, aromatizantes e flavorizantes. A Naringina é um flavonoide, da classe das flavanonas, presente em muitos vegetais, principalmente em frutas cítricas, e possui conhecidas ações antioxidantes e anti-inflamatórias. Dessa forma, é importante compreender melhor os efeitos causados por esse composto, pois o ser humano está exposto a muitos vegetais que contém este flavonoide. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar uma possível atividade genotóxica da Naringina em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), por meio do ensaio do Cometa. Foi observado que o flavonoide Naringina, não apresenta atividade genotóxica o que, provavelmente, pode contribuir para uma melhora da qualidade de vida daqueles que o consomem.

Introdução

A alimentação humana vem sendo alvo de muitos estudos. Isso acontece, pois ela é a principal porta de entrada para o organismo, de substâncias desconhecidas. Essas substâncias podem ser benéficas ou maléficas, para o ser humano (SERVAN-SCHREIBER, 2008).

Nesse contexto, os flavonoides são altamente investigados, pois algumas de suas atividades já são conhecidas, mas ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. A Naringina é um flavonoide, da classe das flavanonas, presente em muitos vegetais, principalmente em frutas cítricas e possui conhecidas ações antioxidantes e anti-inflamatórias (FANG *et al.*, 2006).

Em relação aos experimentos *in vitro*, vários tipos celulares são usados para a realização dos mesmos, dentre eles, a linhagem celular MCF-7, proveniente de adenocarcinoma mamário humano. Esse tipo celular é muito utilizado para estudos do câncer de mama, pois mesmo sendo uma linhagem transformada, manteve as características do tecido epitelial glandular de origem (GOLDEK, 1990).



Vários testes são feitos para avaliar as atividades de diversos compostos dentre eles, o Ensaio do Cometa avalia os danos primários causados ao DNA, seja por agentes químicos ou físicos, conhecido principalmente, por ser um teste simples e confiável. Consiste basicamente em depositar as células, após tratadas e lisadas, em um filme de agarose sobre uma lâmina, que é então submetida ao princípio da eletroforese (GYORI *et al.*, 2014).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi investigar o possível potencial genotóxico do flavonoide Naringina, por meio do Ensaio do Cometa, em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7).

Materiais e Métodos

Para o Ensaio do Cometa foi utilizado o protocolo segundo Tice *et al.* (2000) e para isso foram montados 15 frascos de culturas de 25cm² com 10⁶ células da linhagem MCF-7, com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal.

Após 24 horas de estabilização, o meio de cultura foi descartado e substituído pelas seguintes soluções: Controle: 3 frascos com meio de cultura DMEM suplementado com soro bovino fetal; Agente genotóxico: 3 frascos com Benzo[a]pireno 80µg/mL; Tratamentos: 3 frascos com solução de Naringina 50µM; 3 frascos com solução de Naringina 100µM; 3 frascos com solução de Naringina 150µM. Após 3 horas de tratamento as células foram tripisinizadas, centrifugadas e colocadas em lâminas pré-gelatinizadas com agarose. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise por 2 horas. Após isso, foi realizada a eletroforese, por 20 minutos (300mA e 25V).

As lâminas foram neutralizadas e coradas com brometo de etídeo para observação em microscopia de fluorescência. A análise estatística foi realizada com o Teste ANOVA seguido do Teste de Dunett, comparando os resultados dos tratamentos com o controle. Foi considerado estatisticamente significativo ** $p < 0,01$.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com a análise em microscopia de fluorescência encontram-se na Figura 1. Os testes demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e qualquer uma das concentrações (50µM, 100µM e 150µM) testadas da Naringina. Além disso, todos os tratamentos e o controle apresentaram grande diferença estatística em relação ao resultado do tratamento com o agente genotóxico.

Outros trabalhos também demonstraram a mesma atividade deste flavonoide, que nessas concentrações, não foi capaz de induzir nenhum tipo de dano celular ou molecular, tanto em experimentos *in vitro*, quanto *in vivo* (ALVAREZ-GONZALEZ *et al.*, 2002). Trípoli *et al.* (2007) observaram por meio do teste de citotoxicidade do MTT, em células PC12, pré-tratadas com



a Naringina, que estas não foram lesadas pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um conhecido agente citotóxico.

Os resultados obtidos corroboram com o que foi observado por Buzo, *et al.* (2014). Segundo os autores, a Naringina também foi incapaz de causar dano no DNA de células tumorais de fígado (HepG2/C3A), quando foi realizado o Ensaio do Cometa.

Por outro lado, segundo o estudo feito por Bacanli *et al.* (2015), altas concentrações de Naringina podem ter um efeito protetor nas células, diminuindo a quantidade de micronúcleos observados e também protegendo o DNA contra o dano provocado por peróxido de hidrogênio.

Portanto, visto que a Naringina não é capaz de induzir dano, trabalhos que investigam seu efeito protetor devem ser preconizados. Além disso, devido aos resultados obtidos por Bacanli *et al.* (2015), também faz-se necessário a investigação da segurança do uso de altas concentrações desse flavonoide.

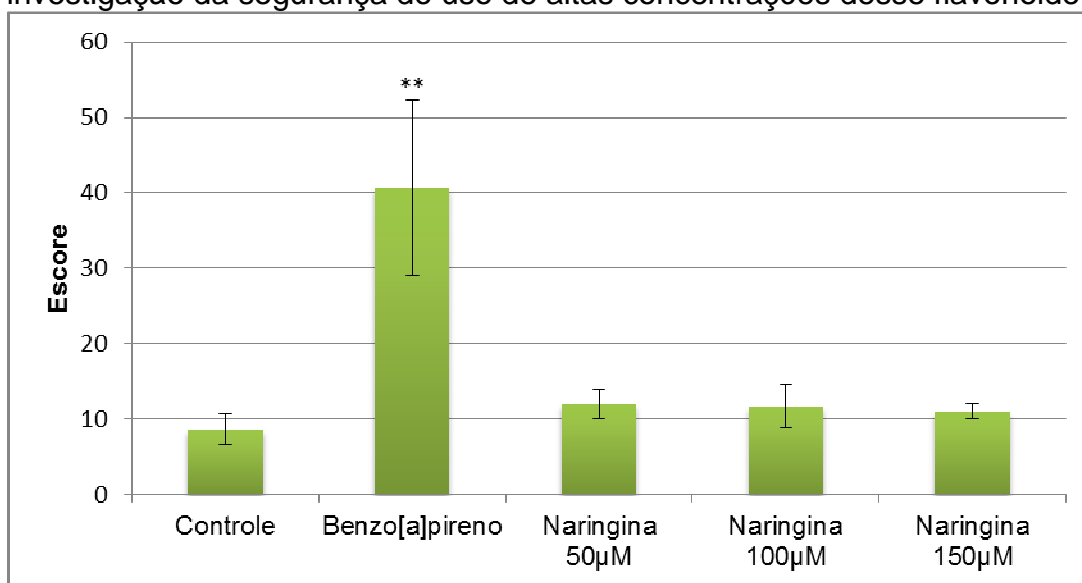
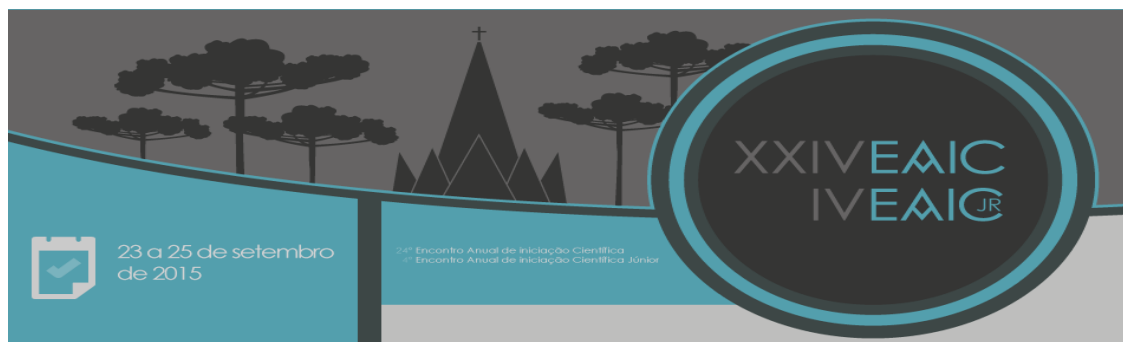


Figura 1 – Escore de danos observado em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), após tratamento de 3 horas, com o flavonoide Naringina, nas concentrações de 50, 100 e 150 μ M. Benzo[a]pireno = 80 μ g/mL e Controle = DMSO < 1%.

** Diferença significativa em relação ao Controle, $p < 0,01$.

Conclusões

Os resultados apresentados mostram que o flavonoide Naringina não possui efeito genotóxico nas células MCF-7. De acordo com o observado até o presente nas pesquisas realizadas, as frutas cítricas que contém a Naringina podem ser consumidas normalmente pela população, sem que haja algum malefício pela presença desse flavonoide. Mas, outro enfoque está sendo dado nas pesquisas com a Naringina: a investigação do seu efeito protetor, e isso é muito importante para que se descubram novas propriedades benéficas desse flavonoide.



Agradecimentos

Agradeço a Deus, aos meus pais e familiares, à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini, aos meus colegas do laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental do Departamento de Biotecnologia, Biologia Celular e Genética e ao CNPq.

Referências

ALVAREZ-GONZALES, E; BUJADAR, E. M; DORADO, V; AGUIRRE, J. J. E. Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. **Mutation Research**, p. 480–489, 2001.

BACANLI, M; BASARAN, A. A; BASARAN, N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1-11, 2015.

BUZO, M. G; FERNANDES, L. M; VICENTINI, V.E.P. Avaliação do efeito genotóxico do flavonoide Naringina em células de hepatoma humano (HepG2/C3A). In: **Anais do 23º EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica**, Londrina, 2014.

FANG, T; WANG, Y; MA, Y; SU, W; BAI, Y, ZHAO, P. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 454-459, 2006.

GYORI, B. M; VENKATACHALAM, G; THIGARAJAN, P.S; HSU, D; CLEMENT, M. Open Comet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**, n. 2, p. 457-465, 2014.

SERVAN-SCHREIBER, D. **Anticâncer: Prevenir e vencer usando nossas defesas naturais**. 1ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2008.

TICE, R.R; AGURELL, E; ANDERSON, D; BURLINSON, B; HARTMANN, A; KOBAYASHY, H; MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, J. C; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-212, 2000.

TRIPOLI, E; GUARDIA, M; GIAMMANCO, S; MAJO, D; GIAMMANCO, M. *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, p. 466-479 2007.